

## Участие активных форм кислорода в регуляции $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых $\text{K}^+$ -каналов эритроцитов

Трубачева О.А.<sup>1</sup>, Кремено С.В.<sup>2</sup>, Петрова И.В.<sup>1</sup>, Ситожевский А.В.<sup>2</sup>,  
Груздева О.В.<sup>2</sup>, Иванов В.В.<sup>1</sup>, Суслова Т.Е.<sup>2</sup>

## Participation of reactive oxygen species in regulation of $\text{Ca}^{2+}$ -activated $\text{K}^+$ channels of erythrocytes

Trubacheva O.A., Kremeno S.V., Petrova I.V., Sitozhevsky A.V., Gruzdeva O.V., Ivanov V.V., Suslova T.Ye.

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> НИИ кардиологии СО РАМН, г. Томск

© Трубачева О.А., Кремено С.В., Петрова И.В. и др.

Изучен эффект прединкубации эритроцитов с активными формами кислорода, генерируемыми системой ксантиноксидаза — ксантин, на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны этих клеток. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция в присутствии кальциевого ионофора  $\text{A}_{23187}$  вело к гиперполяризации эритроцитарной мембраны вследствие открывания  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов. Мембранный потенциал эритроцитов был зарегистрирован благодаря измерению pH среды инкубации в присутствии протонофора. Инкубация эритроцитов в присутствии ксантина (100 мкмоль) и ксантиноксидазы (10 мУ/мл) приводило к значительному снижению амплитуды и скорости развития гиперполяризации, а также к уменьшению скорости восстановления мембранного потенциала. Эти эффекты могут быть вызваны перекисью водорода — одним из продуктов ксантиноксидазной реакции.

**Ключевые слова:** эритроциты,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы, активные формы кислорода.

In this study, we investigated the effects of preincubation with the reactive oxygen species-generating system xanthine oxidase/xanthine on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potassium permeability of erythrocyte membrane. The increase of intracellular calcium concentration in presence of calcium ionophore  $\text{A}_{23187}$  led to erythrocyte membrane hyperpolarization due to opening of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. Erythrocyte membrane potential was recorded via measurement of pH of the incubation medium in presence of protonophore. Incubation of erythrocytes with xanthine (100  $\mu\text{mol}$ )/ xanthine oxidase (10 mU/ml) mixture resulted in significant loss of amplitude and rate of hyperpolarization response and also loss the rate of membrane potential restoration. These effects can be caused by hydrogen peroxide, one of products of reaction of xanthine oxidase/xanthine.

**Key words:** erythrocytes,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels, reactive oxygen species.

УДК 612.111:612.014.464

### Введение

Роль активных форм кислорода (АФК) в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, диабет и другие, достаточно хорошо изучена [3]. Однако в последние годы появляется все больше работ, в которых

исследуется сигнальная роль АФК, в частности обсуждается механизм включения этих соединений в регуляцию ионтранспортных систем клетки. Так, активные кислородные радикалы, образующиеся при активации мембраносвязанной НАДФН-оксидазы, регулируют  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эозинофилов [9]. Известно ингибирующее влияние супероксид-ани-

она на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу саркоплазматического ретикула гладкомышечных клеток сосудов [6].

Традиционной моделью для изучения ионного транспорта служат клетки красной крови. Мембрана эритроцитов содержит только один тип каналов, а именно  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы, что позволяет проводить исследования на суспензии интактных эритроцитов. Показано, что  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы вносят определенный вклад в деформируемость красных клеток крови [8]. В процессе функционирования эритроциты подвергаются действию многих физико-химических факторов, одним из которых являются АФК, постоянно образующиеся в организме. Роль этих соединений в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов эритроцитов не изучена, в связи с чем проведение настоящего исследования представляется весьма актуальным.

## Материал и методы

В работе использовалась кровь практически здоровых добровольцев (18 человек). Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ЕД на 1 мл крови). После центрифугирования (1000g, 5 мин, 4 °С) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали тремя частями изотонического раствора  $\text{NaCl}$  (150 ммоль), содержащего  $\text{Na}$ -фосфатный буфер с концентрацией 5 ммоль ( $\text{pH} = 7,4$ ), при тех же условиях центрифугирования. Для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям  $\text{pH}$  среды инкубации в присутствии протонифора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [6]. Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения гиперполяризационного ответа к 4,75 мл среды инкубации (среда N), содержащей 150 ммоль  $\text{NaCl}$ , 1 ммоль  $\text{KCl}$ , 1 ммоль  $\text{MgCl}_2$ , 10 ммоль глюкозы и 10 мкмоль  $\text{CaCl}_2$ , добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при температуре 37 °С и постоянном перемешивании добавляли

протонифор  $\text{Cl-CCCP}$  до конечной концентрации 20 мкмоль и спустя 2 мин добавляли  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофор  $\text{A}_{23187}$  в концентрации 0,5 мкмоль. Добавление кальциевого ионофора  $\text{A}_{23187}$  к суспензии клеток, содержащей хлорид кальция, приводило к выходу ионов калия и развитию гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов, что находило отражение в изменении  $\text{pH}$  суспензии. Защелачивание среды инкубации соответствовало гиперполяризации мембраны, а восстановление  $\text{pH}$  — возвращению мембранного потенциала (МП) к исходному значению. Амплитуда ГО и скорость его развития характеризуют  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы, а скорость восстановления МП — активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы [6] (рис. 1).

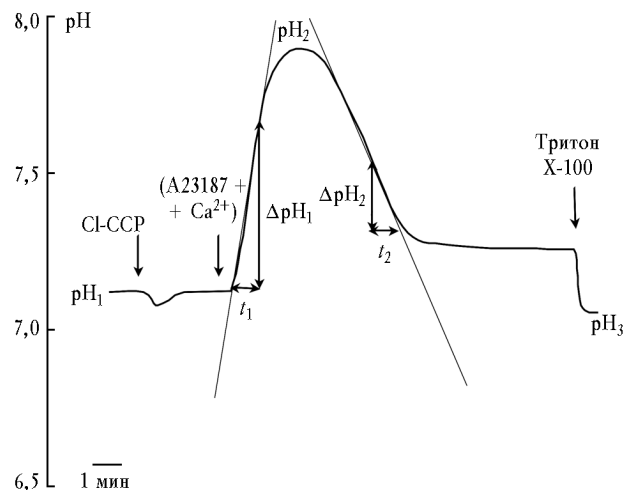


Рис. 1. Типичная кинетика изменения  $\text{pH}$  в суспензии эритроцитов человека в ответ на добавление  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора  $\text{A}_{23187}$  в концентрации 0,5 мкмоль в присутствии 10 мкмоль  $\text{CaCl}_2$  и протонифора  $\text{Cl-CCCP}$  в концентрации 20 мкмоль (представлена как иллюстрация метода расчета стационарных и кинетических параметров)

В качестве продуцента АФК — супероксид-аниона и перекиси водорода использовалась система, включающая ксантин (100 мкмоль) и ксантинооксидазу (10 мU/мл). Продукцию супероксид-аниона оценивали спектрофотометрически. В одну кювету объемом 1 мл добавляли к среде инкубации эритроцитов ксантин в концентрации 100 мкмоль, ксантинооксидазу — 10 мU/мл и цитохром с — 50 мкмоль. Измерения проводи-

лись против кюветы, содержащей среду и цитохром с в концентрации 50 мкмоль. Продукцию супероксид-аниона оценивали по степени восстановления цитохрома с при длине волны 550 нм. Спектрофотометрические исследования показали, что максимальная продукция супероксид-аниона наблюдалась при 10 мин инкубации. Концентрация супероксид-аниона в среде инкубации в описанных условиях составила 9 мкмоль. Другим продуктом реакции с участием ксантиноксидазы является перекись водорода, что находит отражение в снижении содержания супероксид-аниона.

В первой серии экспериментов эритроциты инкубировались в присутствии ксантина (100 мкмоль) и ксантиноксидазы (10 мл/мл) в среде n. Инкубация проводилась в течение 10, 20, 30 мин, после чего клетки отмывали в стандартных условиях. Такой же процедуре подвергались эритроциты, используемые в контрольных экспериментах, но среда их инкубации не содержала ксантина и ксантиноксидазу. Измерения параметров ГО проводились в среде n.

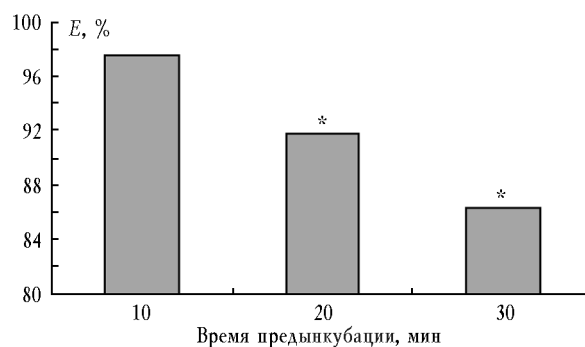
Во второй серии экспериментов к суспензии эритроцитов добавлялась перекись водорода в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 и 1 мкмоль. В ряде случаев среда инкубации эритроцитов содержала аминотриазол — проникающий ингибитор каталазы в концентрации 0,026 моль.

Для оценки влияния изученных факторов на параметры гиперполяризационного ответа эритроцитов рассчитывались средние значения каждого параметра, определялась ошибка среднего. Для оценки достоверности различия средних значений по малым независимым выборкам, если распределение было ненормальным или достоверно различались генеральные дисперсии, использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения зависимых групп, если распределение было ненормальным или достоверно различались генеральные дисперсии, использовался непараметрический критерий Вилкоксона [2, 3].

## Результаты и обсуждение

Амплитуда ГО эритроцитов, подвергнутых предынкубации в присутствии ксантина и ксан-

тиноксидазы в течение 10 мин, не отличалась от контрольных значений и составила  $(97,57 \pm 0,96)\%$  ( $n = 7$ ;  $p > 0,05$ ). Как показали спектрофотометрические исследования, максимальная продукция супероксид-аниона наблюдалась через 10 мин инкубации ксантина и ксантиноксидазы в выбранных концентрациях. Известно, что  $O_2^-$  практически не проникает через мембрану клеток и к тому же обладает малой реакционной способностью [1]. Другим продуктом ксантиноксидазной реакции является перекись водорода, для которой липидный бислой мембраны не является препятствием. Увеличение времени предынкубации до 20 и 30 мин вызвало достоверное снижение амплитуды ГО эритроцитов:  $(91,8 \pm 0,84)\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(86,36 \pm 0,76)\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно (рис. 2,а). Кроме того, при всех вариантах предынкубации обнаружено достоверное снижение скорости развития ГО эритроцитов (параметр  $V_1$ ), которая составила  $(54,38 \pm 1,39\%)$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,02$ ),  $(65,52 \pm 1,39\%)$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,02$ ) и  $(56,39 \pm 1,95\%)$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,02$ ) соответственно для 10, 20 и 30 мин (рис. 2,б). Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов (параметр  $V_2$ ), отражающая активность  $Ca^{2+}$ -насоса мембраны этих клеток, достоверно снижалась только при 30 мин предынкубации:  $(75,74 \pm 2,01\%)$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) (рис. 2,в). Наиболее вероятным объяснением полученных данных может быть влияние перекиси водорода на  $Ca^{2+}$ -активируемую калиевую проницаемость и  $Ca^{2+}$ -насос мембраны эритроцитов. Действительно, имеются сведения, что  $H_2O_2$  ингибирует активность  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы саркоплазматического ретикула гладкомышечных клеток [5, 6].



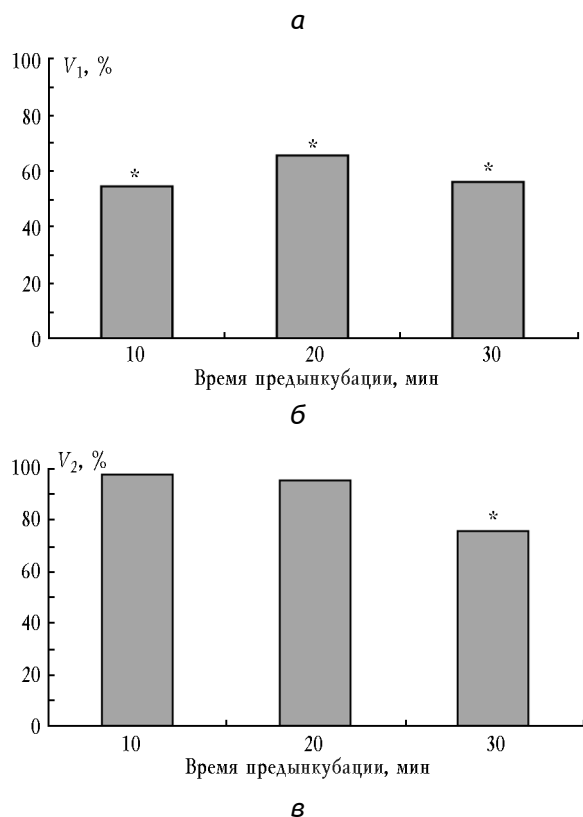


Рис. 2. Изменения параметров гиперполяризационного ответа эритроцитов, прединкубированных с системой ксантин – ксантиноксидаза: \* – параметры, достоверно отличающиеся от контрольных с  $p < 0,05$ ; а – амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов; б – скорость гиперполяризации эритроцитов; в – скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов

Для проверки предположения о влиянии  $\text{H}_2\text{O}_2$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов была проведена серия экспериментов с добавлением перекиси водорода в среду инкубации клеток. Достоверное снижение амплитуды ГО до  $(93,86 \pm 5,04)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) обнаруживалось в присутствии перекиси водорода в концентрации 0,5 мкмоль в среде инкубации (рис. 3,а). Параметры  $V_1$  и  $V_2$  достоверно не изменялись в присутствии всех использованных концентраций перекиси водорода.

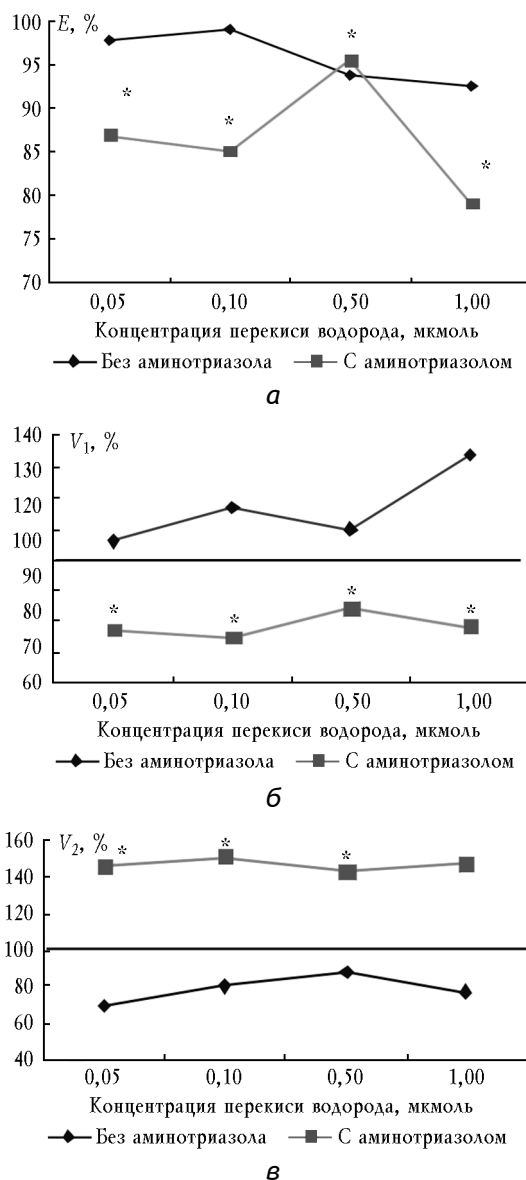


Рис. 3. Влияние перекиси водорода на параметры гиперполяризационного ответа эритроцитов в присутствии и отсутствии аминотриазола: \* – обозначены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных с  $p < 0,05$ ; а – амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов; б – скорость гиперполяризации эритроцитов; в – скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов

Обработка эритроцитов проникающим ингибитором каталазы аминотриазолом привела к достоверному снижению амплитуды ГО эритроцитов и при более низких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Так, этот параметр составил  $(86,82 \pm 5,69)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ );  $(85,05 \pm 0,85)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(79,02 \pm 0,91)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно при

концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,05; 0,1 и 1 мкмоль (рис. 3,б). В присутствии аминотриазола обнаружено значительное снижение скорости развития ГО эритроцитов при всех использованных концентрациях перекиси водорода. Этот параметр составил  $(77,08 \pm 1,09)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ );  $(74,73 \pm 4,24)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ );  $(83,78 \pm 4,26)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(78,51 \pm 1,55)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно при концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 и 1 мкмоль (рис. 3,в). Кроме того, оказалось, что скорость восстановления ГО эритроцитов, обработанных аминотриазолом, достоверно увеличивалась и составила при концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 и 1 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  соответственно  $(146,35 \pm 5,59)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ );  $(151,06 \pm 3,52)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ );  $(143,27 \pm 4,32)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(146,85 \pm 3,57)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о снижении  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости и, напротив, об увеличении активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса мембраны эритроцитов, причем эффект возрастал в присутствии ингибитора каталазы. Последнее, видимо, связано с ростом концентрации перекиси в цитозоле эритроцитов.

Ранее было показано, что управление  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемыми калиевыми каналами имеет сложный характер. Возможно, наблюдаемые эффекты в присутствии перекиси водорода связаны с изменением сульфгидрильных SH-групп белков самого канала или белков цитоскелета. Действительно, ранее были получены сведения о снижении амплитуды гиперполяризационного ответа в присутствии модификаторов SH-групп [5, 6]. Кроме того, имеются данные о влиянии протеинкиназы С на  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов [6]. Известно, что активность этого фермента меняется в присутствии АФК. Возможно, изменение активности протеинкиназы С в присутствии перекиси водорода вносит свой вклад в изменение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Кроме того, известно, что мишенью действия АФК является  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза [3]. Ее ингибирование способствует снижению градиента ионов калия, имеющегося на мембране эритроцита, что, в свою очередь, может привести к уменьшению активности  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов. Действительно, ранее было обнаружено, что диссипация калиевого градиента эритроцитов вследствие ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

АТФ-азы оубаином приводила к снижению амплитуды ГО эритроцитов [5, 6, 11]. Увеличение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы эритроцитов, обнаруженное в присутствии перекиси водорода и ингибитора каталазы, о чем свидетельствует рост параметра  $V_2$ , может быть также связано с изменением активности протеинкиназы С. Протеинкиназа С может не только непосредственно влиять на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу, фосфорилируя белки насоса, но и модулировать активность этой ионотранспортирующей системы через другие регуляторные системы клетки, например через аденилатциклазный сигнальный путь [10, 12].

## Заключение

В ходе настоящего исследования установлено, что АФК, в частности перекись водорода, вмешиваются в регуляцию  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов и, вероятно,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы эритроцитов. Свое действие на  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемую калиевую проницаемость эритроцитов АФК могут реализовывать различными путями. Один из них связан с влиянием на SH-группы белков канала или цитоскелета. Другой путь может быть опосредован протеинкиназой С, активность которой меняется под действием АФК. Не исключено также, что подавление активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы АФК, приводящее к диссипации градиента ионов калия, вызывает снижение амплитуды ГО.

## Литература

1. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистика. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М., 1998. 591 с.
- 2.

**Трубачева О.А., Кремено С.В., Петрова И.В. и др. Участие АФК в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов эритроцитов**

3. **Владимиров Ю.А.** Свободные радикалы в клетке // Нейрохимия. 1996. № 13. С. 47—54.
4. **Болдырев А.А.** Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине / Под ред. Т.М. Турпаева. М.: Изд-во МГУ, 1998. С. 119—139.
5. **Колесниченко Л.С., Кулинский В.И.** Глутатионтранс-феразы // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. С. 179—194.
6. **Колосова М.В., Петрова И.В., Соколова И.Б. и др.** Роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов эритроцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 124. № 6. С. 653—655.
7. **Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др.**  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. № 9. С. 885—903.
8. **Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М.** Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень, 1997. 140 с.
9. **Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K.** Effect of nitric oxide on red blood cell deformability // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2003. V. 284. P. H1577—H1584.
10. **De Vriese A.S., Verbeuren T.J., De Voorde J.V et al.** Endothelial dysfunction in diabetes // J. Pharmacol. 2000. V. 130. P. 963 — 974.
11. **Symeonidis A., Athanassiou G., Psiroyannis A. et al.** Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients // Clin. Lab. Haem. 2001. V. 23. P. 103—109.
12. **Sohal R.S., Svensson I., Sohal B.H., Brunk U.T.** Superoxide anion radical production in different animal species // Med. Ageing and Develop. 1989. № 49. P. 129—135.
13. **Vestergaard-Bogind B.** Spontaneous inactivation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels of human red cells at high intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activity // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 730. P. 285—294.

Поступила в редакцию 24.02.2009 г.

Утверждена к печати 19.03.2009 г.

**Сведения об авторах**

**И.В. Петрова** — д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Иванов** — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии СибГМУ (г. Томск)

**А.В. Ситожевский** — канд. мед. наук, научный сотрудник НИИ кардиологии СО РАМН, (г. Томск).

**Т.Е. Суслова** — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ кардиологии СО РАМН, (г. Томск).

**С.В. Кремено** — канд. мед. наук, научный сотрудник НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

**О.В. Груздева** — канд. мед. наук, научный сотрудник НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

**О.А. Трубачева** — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**Для корреспонденции**

**Трубачева Оксана Александровна**, тел. 8-909-954-9916, otrubacheva@inbox.ru